

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی

عنوان:

بررسی اثرات فیزیولوژیک هورمون تیروکسین در  
بیان ژن گیرنده‌های هورمون تیروئید در تخم و لاروهای  
ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)

مجری:

سلمان ملک پور کلبادی نژاد

شماره ثبت

۶۴۹۰۸

وزارت جهاد کشاورزی  
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی  
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی

عنوان طرح/پروژه: بررسی اثرات فیزیولوژیک هورمون تیروکسین در بیان ژن گیرنده‌های هورمون تیروئید در تخم و لاروهای ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)  
کد مصوب: ۲۶-۹۱۰۹۹۱-۰۴۰-۱۲-۹۵-۲۴

نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: سلمان ملک پور کلبادی نژاد  
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد): -  
نام و نام خانوادگی مجری: سلمان ملک پور کلبادی نژاد  
نام و نام خانوادگی همکار(ان): محمود بهمنی، سلطنت نجارلشگری، محمد اسماعیل راست روان، میثم عرفانی، مهدی گلشن، سجاد نظری، ایوب یوسفی جوردی، رضوان اله کاظمی، بهروز بهرامیان، محمدتقی آذیر، عبدالعظیم فاضل، فرهاد شایقی، حمیدرضا جوشقانی، مسعود حقیقی، عبدالمجید حاجی مرادلو، Filipe Castro، شیرین جمشیدی، حسن قربان ساسانی، ابوالفتح رضوانی، غلامرضا لشتوآقائی، نورالله خداپرست، یونس گلعلی پور  
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): بهرام فلاحتکار  
نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان مازندران

تاریخ شروع: ۱۳۹۹/۱۰/۰۱

مدت اجرا: ۱ سال و ۲ ماه

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۴۰۲

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است.

## «سوابق طرح یا پروژه و مجری مسؤل / مجری»

طرح/پروژه: بررسی اثرات فیزیولوژیک هورمون تیروکسین در بیان ژن گیرنده های هورمون تیروئید در تخم و لاروهای ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)

کد مصوب: ۲۶-۹۹۱۰۴۰-۱۲-۹۵-۲۴

شماره ثبت (فروست): ۶۴۹۰۸ تاریخ: ۱۴۰۲/۱۱/۲۳

با مسؤلیت اجرایی جناب آقای سلمان ملک پور کلبادی نژاد دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته شیلات (فیزیولوژی آبزیان) است.

پروژه توسط داوران منتخب بخش زیست فناوری و فرآوری آبزیان در

تاریخ ۱۴۰۲/۱۱/۱۵ مورد ارزیابی و با رتبه خوب تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در:

ستاد  پژوهشکده  مرکز  ایستگاه

با سمت عضو هیئت علمی در مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه
چکیده		۱
۱- مقدمه		۲
۱-۱- ماهی آزاد دریای خزر و اهمیت آن		۲
۱-۲- اندوکراینولوژی: هورمون های درون ریز		۳
۱-۳- هورمون های تیروئیدی		۳
۱-۴- بیان مسئله		۶
۱-۵- گیرنده های هورمون تیروئیدی		۷
۱-۶- سوابق تحقیق در داخل و خارج از کشور با تاکید بر نتایج آنها		۷
۱-۶-۱- وجود TRs در گونه های مختلف ماهیان		۱۰
۱-۶-۲- روش های بکارگیری هورمون		۱۱
۱-۶-۲-۱- تزریق		۱۱
۱-۶-۲-۲- کاشت		۱۲
۱-۶-۲-۳- تجویز خوراکی		۱۲
۱-۶-۲-۴- غوطه وری		۱۳
۱-۷- اهداف		۱۳
۱-۷-۱- فرضیات تحقیق		۱۳
۱-۷-۲- اهداف تحقیق		۱۳
۲- مواد و روش ها		۱۴
۲-۱- آماده سازی محلول های هورمون تیروکسین		۱۴
۲-۲- جمع آوری نمونه ها		۱۴
۲-۳- انتقال نمونه ها		۱۶
۲-۴- محاسبات انجام شده در مورد اثرات غلظت های مختلف حمام تیروکسین		۱۷
۲-۵- مشکلات و نکات تاثیرگذار در روند اجرای پروژه		۱۷
۲-۶- روش های ژنتیک مولکولی		۲۴
۲-۶-۱- مراحل استخراج RNA		۲۵
۲-۶-۲- ارزیابی کیفیت RNA با روش الکتروفورز ژل آگارز		۲۵

۲۸	۳-۶-۲ ساختن (cDNA) complementary DNA
۲۸	۴-۶-۲ روش (RT-PCR) Reverse transcription
۳۱	۵-۶-۲ استقرار شرایط آزمایشگاهی و واکنش تکثیر زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR)
۳۱	۱-۵-۶-۲ شرایط بهینه PCR و انتخاب پرایمر مناسب
۳۴	۶-۶-۲ روش (qPCR) Quantitative Real-time PCR
۳۵	۷-۲ روش‌های تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها
۳۶	۳- نتایج
۳۶	۱-۳-۱ نتایج حمام تیروکسین بر روی درصد لقاح، چشم زدگی و تفریخ
۳۸	۲-۳-۲ نتایج بررسی کمیت و کیفیت RNA استخراج شده
۳۹	۱-۲-۳ روش الکتروفورز
۳۹	۲-۲-۳ RNA ریوزومی
۴۱	۳-۲-۳ روش اسپکتوفتومتری
۴۳	۳-۳ نتایج الکتروفورز محصول PCR
۴۴	۴-۳ نتایج (qPCR) Quantitative Real-time PCR
۴۷	۱-۴-۳ بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید ( <i>thrb</i> ) براساس غلظت در طول زمان‌های مختلف
۴۸	۲-۴-۳ بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید ( <i>thrb</i> ) براساس زمان در غلظت‌های مختلف
۴۹	۳-۴-۳ بیان ژن گیرنده هورمون تیروئید ( <i>thrb</i> ) براساس غلظت و زمان (Two-way interaction plot)
۵۰	۵-۳ نتایج آنالیز داده‌ها
۵۰	۱-۵-۳ نتایج تست دانکن (Multiple Range Test Duncan) براساس زمان
۵۱	۲-۵-۳ نتایج تست دانکن براساس غلظت
۵۳	۴- بحث و نتیجه‌گیری
۵۴	۱-۴-۱ اثرات غلظت‌های مختلف حمام تیروکسین بر روی درصد لقاح، چشم زدگی و تفریخ
۵۶	۲-۴-۲ بیان ژن‌های گیرنده هورمون تیروئید ( <i>thra</i> ، <i>thrb</i> ) در تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر
۵۸	۵- جمع‌بندی
۵۹	پیشنهادها
۶۱	منابع
۶۶	چکیده انگلیسی

## چکیده

ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo caspius*)، (Kessler ۱۸۷۷) گونه‌ی مهاجر رودرو از ماهی قزل‌آلای قهوه‌ای است که در لیست گونه‌های در خطر انقراض قرار گرفته است. در دو دهه اخیر کاهش چشم‌گیری جمعیت‌های طبیعی این گونه به دلایل مختلف اتفاق افتاده است که از آن جمله می‌توان به آلودگی آب، برداشت و تخریب بستر رودخانه‌های مسیر مهاجرت و همچنین صید بی‌رویه اشاره کرد. در این پروژه درصد لقاح، چشم‌زدگی و تفریخ تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر و همچنین تغییرات بیان ژن‌گیرنده‌های هورمون تیروکسین (TRs) (*thra* و *thrβ*) از زمان لقاح تا جذب کامل کیسه زرده در حالی که به مدت زمان ۱ ساعت با روش غوطه‌وری در معرض هورمون تیروکسین با غلظت‌های ۰ (بدون افزودن هورمون، شاهد)، (بدون افزودن هورمون، فقط حلال)، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۰/۷۵ میلی‌گرم در لیتر قرار گرفته بودند مورد ارزیابی قرار گرفت. نمونه برداری از تخمک‌ها قبل (t1) و تخم‌ها بعد از لقاح (t2) و لاروها تا جذب کیسه زرده در ۴۸ ساعت اول هر ۲۴ ساعت یکبار (t3، t4) و ۲۵ روز بعد از لقاح در مرحله چشم‌زدگی (t5)، در زمان‌های تفریخ (t6) و جذب کامل کیسه زرده (t7) انجام شد. نتیجه تجزیه و تحلیل‌های آماری بیانگر عدم وجود تفاوت معنی‌دار ( $p > 0.05$ ) در مورد درصد لقاح تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر بود در حالی که درصد چشم‌زدگی و تفریخ تخم‌ها در غلظت‌های بالاتر هورمونی کاهش معنی‌داری را نشان دادند ( $p < 0.05$ ). نتایج تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس دوطرفه اثرات تغییرات غلظت و زمان‌های مختلف روند افزایشی داشته و همچنین اثر متقابل غلظت و زمان در بیان ژن *thrb* را نشان دادند در حالیکه علی‌رغم استفاده از پرایمرهای طراحی شده مختلف شناسایی بیان ژن *thra* موفقیت‌آمیز نبود. در همگی غلظت‌ها روند افزایشی معنی‌دار در بیان ژن *thrb* تا t6 مشاهده شد در حالی که در t7 بجز تیمار شاهد در سایر تیمارها روند نزولی مشاهده شد. مقایسه گروه‌های مختلف (تست دانکن) وجود اختلاف معنی‌داری ( $p < 0.05$ ) بین تمام زمان‌ها و غلظت‌ها در طول دوره نمونه برداری را نشان داد. در مجموع مشاهده ارتباط معکوس بین افزایش میزان غلظت هورمون تیروکسین با درصد چشم‌زدگی و تفریخ تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر با هدف اصلی تعیین شده برای پروژه حاضر به طور مشخصی در تضاد بود در حالیکه اثرگذاری مثبت غلظت‌های به کار رفته هورمونی در میزان بیان ژن *thrβ* مشاهده شد. به طور کلی، می‌توان نتیجه گرفت که غوطه‌وری تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر در دوزهای به کار رفته T4 ممکن است ER و HR را بهبود نبخشد، بنابراین داده‌ها و/یا تفسیرهای کاربردی‌تری برای اهداف مدیریت آبی پروری مورد نیاز است.

**کلمات کلیدی:** تخم‌های ماهی آزاد دریای خزر، تیروکسین، گیرنده‌های هورمون تیروئید (*thra* و *thrβ*)، لقاح، چشم‌زدگی، تفریخ